

**ASSAY OF CHOLESTEROL IN LOW DENSITY LIPOPROTEIN**

Patent Number: JP10038888

Publication date: 1998-02-13

Inventor(s): MATSUI HIROSHI; MIZUNO KAZUE; ITO YASUKI; OBARA SHUICHI; FUJIWARA AKIRA; TAKASUGI KENICHI; OKADA MASAHIKO

Applicant(s):: DENKA SEIKEN CO LTD

Requested Patent: ☐ JP10038888

Application Number: JP19970111944 19970414

Priority Number (s):

IPC Classification: G01N33/92

EC Classification:

Equivalents: JP3058602B2

**Abstract**

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To provide an assay for fractionally determining LDL(low density lipoprotein) cholesterol easily without needing complicated centrifugal separating operation.

**SOLUTION:** This assay of cholesterol in low density lipoprotein in a tested sample that may contain low density lipoprotein, high density lipoprotein, ultra- low density lipoprotein and/or chylomicron consists of a first process of eliminating cholesterol in high density lipoprotein, ultra-low density lipoprotein and chylomicron in a tested sample, and a second process of determining residual cholesterol in the tested sample.

Data supplied from the esp@cenet database - I2

(19)日本国特許庁 (J P)

(12)公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平 1 0 - 3 8 8 8 8

(43)公開日 平成 1 0 年 ( 1 9 9 8 ) 2 月 1 3 日

(51)Int.Cl.<sup>6</sup>

G01N 33/92

識別記号

庁内整理番号

F I

G01N 33/92

技術表示箇所

A

審査請求 未請求 請求項の数 1 4 F D (全 9 頁)

(21)出願番号 特願平 9 - 1 1 1 9 4 4

(22)出願日 平成 9 年 ( 1 9 9 7 ) 4 月 1 4 日

(31)優先権主張番号 特願平 8 - 1 1 6 9 4 4

(32)優先日 平 8 ( 1 9 9 6 ) 4 月 1 5 日

(33)優先権主張国 日本 ( J P )

(71)出願人 5 9 1 1 2 5 3 7 1

デンカ生研株式会社

東京都中央区日本橋茅場町三丁目 4 番 2 号

(72)発明者 松井 寛史

新潟県五泉市大字木越字鏡田 1 3 5 9 - 1

デンカ生研株式会社鏡田工場内

(72)発明者 水野 和重

新潟県五泉市大字木越字鏡田 1 3 5 9 - 1

デンカ生研株式会社鏡田工場内

(72)発明者 伊藤 康樹

新潟県五泉市大字木越字鏡田 1 3 5 9 - 1

デンカ生研株式会社鏡田工場内

(74)代理人 弁理士 谷川 英次郎

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 低密度リボ蛋白中のコレステロールの定量方法

(57)【要約】

【課題】 煩雑な遠心分離操作を要せず、LDLコレステロールを簡便に分別定量する方法を提供すること。

【解決手段】 被検試料中の高密度リボ蛋白、超低密度リボ蛋白及びカイロミクロン中のコレステロールを消去する第1工程と、次いで、被検試料中の残存コレステロールを定量する第2工程とから成る、低密度リボ蛋白、高密度リボ蛋白、超低密度リボ蛋白及び／又はカイロミクロンを含むかもしれない被検試料中の低密度リボ蛋白中のコレステロールの定量方法を提供した。

## 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 被検試料中の高密度リボ蛋白、超低密度リボ蛋白及びカイロミクロン中のコレステロールを消去する第 1 工程と、次いで、被検試料中の残存コレステロールを定量する第 2 工程とから成る、低密度リボ蛋白、高密度リボ蛋白、超低密度リボ蛋白及び／又はカイロミクロンを含むかもしれない被検試料中の低密度リボ蛋白中のコレステロールの定量方法。

【請求項 2】 前記第 1 工程は、低密度リボ蛋白以外のリボ蛋白に作用する界面活性剤の存在下において、コレステロールエステラーゼ及びコレステロールオキシダーゼを作用させ、生じた過酸化水素を消去することから成る、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】 前記第 2 工程は、前記第 1 工程の産物に、少なくとも低密度リボ蛋白に作用する界面活性剤を加え、前記コレステロールエステラーゼ及びコレステロールオキシダーゼの作用により生じた過酸化水素を定量することから成る、請求項 2 記載の方法。

【請求項 4】 前記少なくとも低密度リボ蛋白と作用する界面活性剤は、全てのリボ蛋白に作用するものである請求項 3 記載の方法。

【請求項 5】 前記第 1 工程で用いられる、低密度リボ蛋白以外のリボ蛋白に作用する界面活性剤は、HLB 値が 13 以上 15 以下であるポリアルキレンオキサイド誘導体である請求項 1 ないし 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】 前記第 2 工程で用いられる、全てのリボ蛋白に作用する界面活性剤は、HLB 値が 11 以上 13 未満であるポリアルキレンオキサイド誘導体である請求項 4 記載の方法。

【請求項 7】 前記第 1 工程で用いられる、低密度リボ蛋白以外のリボ蛋白に作用する界面活性剤は陽イオン界面活性剤である、請求項 2 記載の方法。

【請求項 8】 前記陽イオン界面活性剤は第 4 級アンモニウム塩を有する請求項 7 記載の方法。

【請求項 9】 前記第 2 工程で用いられる、少なくとも低密度リボ蛋白に作用する界面活性剤は陰イオン界面活性剤である請求項 3 記載の方法。

【請求項 10】 前記第 1 工程は、前記界面活性剤濃度を 0.1～10 g/l として行われる請求項 2 ないし 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 11】 前記第 2 工程は、HLB 値が 11 以上 13 未満である前記ポリオキシアルキレン誘導体又は前記陰イオン界面活性剤の濃度を 1～100 g/l として行われる請求項 6 又は 9 記載の方法。

【請求項 12】 前記第 1 及び第 2 の工程は、pH 5～8 の緩衝液中で行なわれる請求項 1 ないし 11 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 13】 前記緩衝液はアミンを含む請求項 12 記載の方法。

【請求項 14】 上記第 1 及び第 2 工程は、温度 25～40℃で行なう請求項 1 ないし 13 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、動脈硬化症の臨床診断に重要な低密度リボ蛋白 (LDL) 中のコレステロール (以下、「LDL コレステロール」ということがある。本明細書において単に「コレステロール」という場合にはエステル型コレステロール及び遊離型コレステロールの両者を包含する) の分別定量法に関する。

【0002】

【従来の技術】LDL は血液中におけるコレステロール運搬の主役であり粥状動脈硬化において血管壁に沈着したコレステロールは主に LDL に由来している。血漿における LDL の増加は虚血性心疾患等の粥状硬化性疾患の主要な危険因子の 1 つであり、LDL コレステロールを分別定量することは臨床的に有用である。

【0003】従来の LDL コレステロールの定量法は、分画操作とコレステロール定量操作の 2 段階から求める方法と血中の総コレステロール、HDL 中のコレステロール、トリグリセリドをそれぞれに求める Friedewald の式により算出する方法がある。

【0004】分画操作には、超遠心法、沈殿法、免疫化学的方法等がある。超遠心法を用いる場合には、比重の差を利用して超遠心分離機により LDL を分離し、そのコレステロール量を測定するものである。沈殿法は HDL 抗体、ポリアニオン及び 2 価の陽イオンを添加し、不溶性沈殿物を生成させて遠心分離により上清中の LDL コレステロールを定量する方法 (WPI Acc No.85-116848/20) である。免疫化学的方法は HDL、VLDL、CM に対する抗体をラテックスに結合させ、凝集反応後に遠心又はフィルタにより取り除き、LDL コレステロールを定量する方法 (WPI Acc No.84-301275/49) が報告されているが、いずれも簡便性や経済性に問題がある。

【0005】Friedewald の式では総コレステロールから HDL コレステロールを引き、さらにトリグリセリドの 1/5 量を引き LDL コレステロールを求める。しかし、食事の影響や個体差を加味していないため正確性に問題がある。

【0006】また近年、分画操作を要しない LDL コレステロールの定量法 (WPI Acc No.83-766269/38) が報告されているが、LDL に対する特異性が不十分である。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】本発明の課題は、煩雑な遠心分離操作を要せず、LDL コレステロールを簡便に分別定量する方法を提供することである。

【0008】

【課題を解決するための手段】本願発明者らは第 1 工程で低密度リボ蛋白中のコレステロール以外のコレステロ

ールを消去し、続く第2工程において残存するコレステロールを測定することにより、低密度リボ蛋白中のコレステロールを定量することができるを見出し本願第2の発明を完成した。

【0009】すなわち、本発明は、被検試料中の高密度リボ蛋白、超低密度リボ蛋白及びカイロミクロン中のコレステロールを消去する第1工程と、次いで、被検試料中の残存コレステロールを定量する第2工程とから成る、低密度リボ蛋白、高密度リボ蛋白、超低密度リボ蛋白及び／又はカイロミクロンを含むかもしれない被検試料中の低密度リボ蛋白中のコレステロールの定量方法を提供する。

【0010】

【発明の実施の形態】リボ蛋白中に含まれるコレステロールとしては、エステル型コレステロール（コレステロールエステル）及び遊離型コレステロールがある。本明細書において、単に「コレステロール」という場合には、これらの両者を包含する。

【0011】本発明の方法に供される被検試料としては、HDL、LDL、VLDL及びCM等のリボ蛋白を含むかもしれない試料であればいずれのものでもよく、例えば、血液、血清、血漿等の体液やその希釈物を挙げることができるがこれらに限定されるものではない。

【0012】本発明の方法は、第1工程及び第2工程から成り、第1工程では被検試料中のHDL、VLDL及びCM中のコレステロールを消去し、続く第2工程では、被検試料中の残存コレステロールを定量する。第1工程でHDL、VLDL及びCM中のコレステロールが消去されているので、第2工程で定量されるコレステロールは、主として被検試料中のLDL中のコレステロールである。

【0013】第1工程における「消去」とは、コレステロールを分解し、かつ、その分解産物が次の第2工程で検出されないようにすることを意味する。LDL以外のリボ蛋白、すなわち、HDL、VLDL、CM等に含まれるコレステロールを選択的に消去する方法としては以下の方法を挙げることができる。

【0014】すなわち、低密度リボ蛋白以外のリボ蛋白に作用する界面活性剤の存在下において、コレステロールエステラーゼ及びコレステロールオキシダーゼを作用させ、生じた過酸化水素を消去する。

【0015】過酸化水素を消去する方法としては、カタラーゼを作用させて水と酸素に分解する方法、及びベルオキシダーゼを用いてフェノール系又はアニリン系水素供与体化合物と過酸化水素を反応させて無色キノンに転化する方法を挙げることができるが、これらに限定されるものではない。

【0016】第1工程の反応液中のコレステロールエステラーゼ濃度は0.2～1.0 U/ml程度が好ましく、由来としてはシュードモナス属細菌から生成される

ものが効果的である。また、コレステロールオキシダーゼの濃度は0.1～0.7 U/ml程度が好ましく、細菌や酵母由来のものを用いることが好ましい。さらに、カタラーゼの濃度は40～100 U/ml程度が好ましい。また、過酸化水素を無色キノンへ転化する場合のベルオキシダーゼの濃度は0.4～1.0 U/mlが好ましく、フェノール系又はアニリン系水素供与体化合物の濃度としては0.4～0.8 mmol/Lが好ましい。

【0017】第1工程で用いられる、LDL以外のリボ蛋白に作用する界面活性剤の好ましい例として、HLB値が13以上15以下、好ましくは13以上14以下であるポリアルキレンオキシド誘導体を挙げることができる。誘導体の例としては高級アルコール縮合物、高級脂肪酸縮合物、高級脂肪酸アミド縮合物、高級アルキルアミン縮合物、高級アルキルメルカプタン縮合物、アルキルフェノール縮合物を挙げることができる。なお、界面活性剤のHLB算出方法は周知であり、例えば「新界面活性剤」、堀内博著、昭和61年、三共出版に記載されている。

【0018】HLB値が13以上15以下のポリアルキレンオキシド誘導体の好ましい具体例としては、ポリオキシエチレンラウリルエーテル、ポリオキシエチレンセチルエーテル、ポリオキシエチレンオレイルエーテル、ポリオキシエチレン高級アルコールエーテル、ポリオキシエチレンオクチルフェニルエーテル、ポリオキシエチレンノニルフェニルエーテル等でHLB値が13以上15以下の化合物を挙げることができるがこれらに限定されるものではない。

【0019】また、第1工程で用いられる界面活性剤として陽イオン界面活性剤を用いることもできる。この場合の陽イオン界面活性剤としては、下記一般式(I)で示される、第4級アンモニウム塩を親水基として有するものが好ましい。

【0020】

【化1】



【0021】ただし、式(I)中、Rは炭素数1～8の直鎖状のアルキル基を示し、R'は炭素数3～20のアルケニル基を示す。

【0022】第1工程で用いられる上記界面活性剤の濃度は、0.1～10 g/l程度が好ましく、さらに好ましくは0.5～5.0 g/l程度である。

【0023】第1工程は、pH5～8の緩衝液中で行うことが好ましく、緩衝液としてはトリス、トリエタノールアミン、グットの緩衝液等のアミンを含む緩衝液が好ましい。特にグット緩衝液であるBis-Tris、P

IPES、MOPSO、BES、HEPES及びPOP SOが好ましく、緩衝液の濃度は10～500mM程度が好ましい。

【0024】第1工程で、LDLとの反応を抑え、他のリボ蛋白の消去をさらに高めるために、反応液中に2価の金属イオンを含ませてもよい。2価の金属イオンとしては銅イオン、鉄イオン及びマグネシウムイオンを使用することができるが、特にマグネシウムイオンが好ましい。2価の金属イオンの濃度は5～200mM程度が好ましい。

【0025】なお、第1工程の反応液中には、任意的に、リボ蛋白分解酵素を加えることもできる。この酵素を加えることにより、特にVLDL中のコレステロールが反応しやすくなるので好ましい。この酵素の反応液中濃度は、5.0～10.0U/ml程度が好ましい。

【0026】第1工程の反応温度は25～40℃程度が適当であり、37℃が最も好ましい。また、反応時間は2～10分間程度でよい。

【0027】続く第2工程では、被検試料中の残存コレステロールを定量する。これは、例えば、少なくともLDLに作用する界面活性剤を加え、第1工程で加えたコレステロールエステラーゼ及びコレステロールオキシダーゼの作用により生じた過酸化水素を定量することにより行なうことができる。ここで、少なくともLDLに作用する界面活性剤は、LDLのみに選択的に作用する界面活性剤でもよいし、全てのリボ蛋白に作用する界面活性剤であってもよい。

【0028】全てのリボ蛋白に作用する界面活性剤の好ましい例として、HLB値が11以上13未満、好ましくは12以上13未満であるポリアルキレンオキシド誘導体を挙げることができる。誘導体の例としては高級アルコール縮合物、高級脂肪酸縮合物、高級脂肪酸アミド縮合物、高級アルキルアミン縮合物、高級アルキルメルカプタン縮合物、アルキルフェノール縮合物を挙げることができる。

【0029】HLB値が11以上13未満のポリアルキレンオキシド誘導体の好ましい具体例として、ポリオキシエチレンラウリルエーテル、ポリオキシエチレンセチルエーテル、ポリオキシエチレンオレイルエーテル、ポリオキシエチレン高級アルコールエーテル、ポリオキシエチレンオクチルフェニルエーテル、ポリオキシエチレンニルフェニルエーテル等でHLB値が11以上13未満の化合物を挙げることができるがこれらに限定されるものではない。

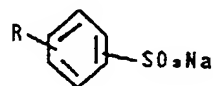
【0030】また、LDLのみに選択的に作用する界面活性剤として、陰イオン界面活性剤を挙げることができる。ここで用いられる陰イオン界面活性剤としては、特に限定されないが、芳香環に炭素数4～18の直鎖状又

は分枝状アルキル基が結合したものを有するものが好ましい。ここで、芳香環は、ベンゼン、ナフタレン、ジフェニール等のように炭素と水素のみから成るものが好ましい。さらに、上記芳香環にスルホン酸塩のような親水基が結合したものが好ましい。このような好ましい陰イオン界面活性剤の例を下記式(II)ないし(VI)に示す。

【0031】

【化2】

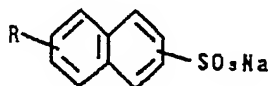
10



(II)

【0032】

【化3】

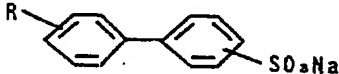


(III)

【0033】

【化4】

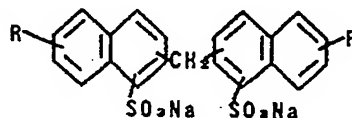
20



(IV)

【0034】

【化5】

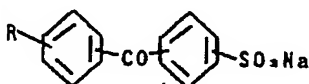


(V)

【0035】

30

【化6】



(VI)

【0036】但し、式(II)～(VI)において、Rは炭素数4～18の直鎖状又は分枝状アルキル基を示す。また、第2工程で用いられる好ましい陰イオン界面活性剤として、高級アルコール硫酸ナトリウム等を挙げることができる。

【0037】第2工程で用いられる界面活性剤の濃度は、0.1～100g/l程度が好ましく、さらに好ましくは1～50g/l程度である。

【0038】第2工程のその他の好ましい反応条件は、第1工程における好ましい反応条件と同様である。

【0039】

【実施例】以下、本発明を実施例に基づきさらに具体的に説明する。もっとも、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

【0040】実施例1

#### 第1試薬

BES緩衝液、pH6.0

100 mmol/L

HDAOS:N-(2-ヒドロキシスルホプロピル)-3,5-

ジメチオキシアニリン

0.7 mmol/L

シュードモナス属細菌由来コレステロールエステラーゼ

(旭化成工業社製商品名「CEN」)

0.8 U/ml

ストレプトミセス属細菌由来コレステロールオキシダーゼ

(東洋紡績社製商品名「COO」)

0.5 U/ml

カタラーゼ

80 U/ml

塩化マグネシウム

10 mmol/L

花王社製エマルゲン B 6 6

(ポリオキシエチレン誘導体 (HLB=13.2) )

0.2 %

【0041】

第2試薬

BES緩衝液、pH7.0

50 mmol/L

4- アミノアンチピリン

4.0 mmol/L

ベルオキシダーゼ

2.4単位/ml

アジ化ナトリウム

0.1%

花王社製エマルゲン A 6 0

(ポリオキシエチレン誘導体 (HLB=12.8) )

5.0%

【0042】コレステロール濃度として100mg/dlに精製したHDL、LDL、VLDL、CMをそれぞれ含む4種類の試料各4  $\mu$ l に、あらかじめ37°Cで加温した第1試薬300  $\mu$ l を混和し、37°Cで5 分間反応させた後に、第2試薬100  $\mu$ l を加え5 分間反応させ、600nm における吸光度を測定した。測定された吸光度からコレステロール量を算出し、試料中のコレステロール量との比を計算して捕捉率を求めた。結果を下記表 1 に示す。

ば、LDL中のコレステロールはかなりの部分について捕らえているが、それ以外のリポ蛋白中コレステロールはほとんど捕らえておらず、LDL中コレステロールを選択的に定量できることがわかる。

【0045】実施例2

【0043】

【表1】

捕捉率			
CM	VLDL	LDL	HDL
<1.0%	<5.0%	70.0 %	<1.0%

【0044】表2に示されるように、上記方法によれ

第1試薬

PIPES緩衝液、pH7.0

50 mmol/L

HDAOS

0.7 mmol/L

シュードモナス属細菌由来コレステロールエステラーゼ

(旭化成工業社製商品名「CEN」)

0.8 U/ml

ストレプトミセス属細菌由来コレステロールオキシダーゼ

(東洋紡績社製商品名「COO」)

0.5 U/ml

カタラーゼ

80 U/ml

塩化マグネシウム

10 mmol/L

花王社製エマルゲン B 6 6

0.2 %

【0046】

第2試薬

PIPES緩衝液、pH7.0

50 mmol/L

4- アミノアンチピリン

4.0 mmol/L

ベルオキシダーゼ  
アジ化ナトリウム  
TritonX100

【0047】実施例1と同様な操作を行い各リポ蛋白との反応性を求めた。結果を下記表2に示す。

【0048】

【表2】

捕捉率			
CM	VLDL	LDL	HDL
〈1.0%〉	〈5.0%〉	71.0 %	〈1.0%〉

【0049】実施例3

#### 第1試薬

グッド緩衝液、pH7.0	50 mmol/l
HDAOS	0.7 mmol/l
コレステロールエステラーゼ	0.8 U/ml
コレステロールオキシダーゼ	0.5 U/ml
カタラーゼ	80 単位/ml
陽イオン界面活性剤（ラウリルトリメチルアンモニウムクロライド）	0.1%

【0052】

#### 第2試薬

4-アミノアンチピリン	4.0 mmol/l
ベルオキシダーゼ	2.4 単位/ml
アジ化ナトリウム	0.1%
非イオン界面活性剤（ポリオキシエチレンラウリルエーテル）	0.1%

（非イオン界面活性剤は第2反応に使用）

【0053】試料20 $\mu$ lに予め37℃で加温した第1試薬180 $\mu$ lを混和し、37℃で5分間反応させた後に、第2試薬を60 $\mu$ l加え5分間反応させ600nmにおける吸光度を測定した。

【0054】図3はLDLコレステロール濃度と吸光度との関係を示すもので、HDL、VLDL及びCM存在下においてもLDLコレステロールを特異的かつ濃度依存的に測定できることを示している。

【0055】実施例5

試料として血清を用い、実施例4の操作を行いLDLコレステロール濃度を求めた。対照法としてFriedewaldの計算式（CLIN.CHEM.,41,1414,1995）を用いて血清中のLDLコレステロール濃度を求めた。その結果を表3に示す。表3に示すように、本発明の方法による結果はFriedewaldの計算式による結果と良好な相関を示した。

【0056】

【表3】

2.4単位/ml  
0.1%  
3.C%

試料として健常人血清を用い、実施例1、2の操作を行い、LDLコレステロール濃度を求めた。対照法としてFriedewaldの計算式（CLIN.CHEM.,41,1414,1995）を用いて血清中のLDLコレステロール濃度を求めた。その結果を図1及び図2の相関図として示した。

10 【0050】図1及び図2に示されるように、両方法による定量結果は非常によく一致しており、本発明の方法により正確にLDL中のコレステロールが定量できることが明らかになった。

【0051】実施例4

	Fridewald	実施例4
検体 1	73.0	60.1
2	91.0	85.8
3	136.4	124.0
4	97.7	98.0
5	75.2	81.8
6	195.7	195.4
7	140.5	112.9
8	112.8	113.2
9	160.6	153.5
10	120.4	111.1

【0057】

【発明の効果】本発明により、煩雑な遠心分離操作を要せず簡便にLDLコレステロールを分別定量する方法が提供された。

50 【図面の簡単な説明】

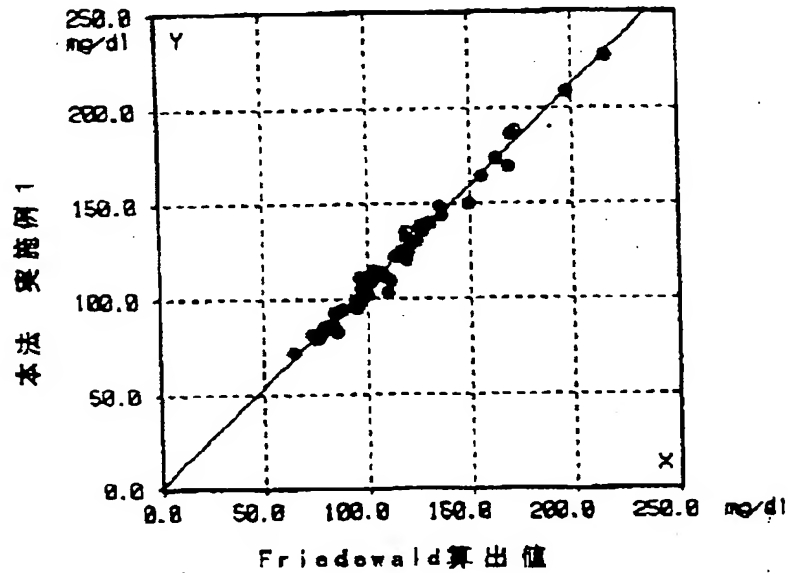
【図1】実施例1におけるLDLコレステロールの測定結果と、Friedewald算出値との相関関係を示す図である。

【図2】実施例2におけるLDLコレステロールの測定結果と、Friedewald算出値との相関関係を示す図である。

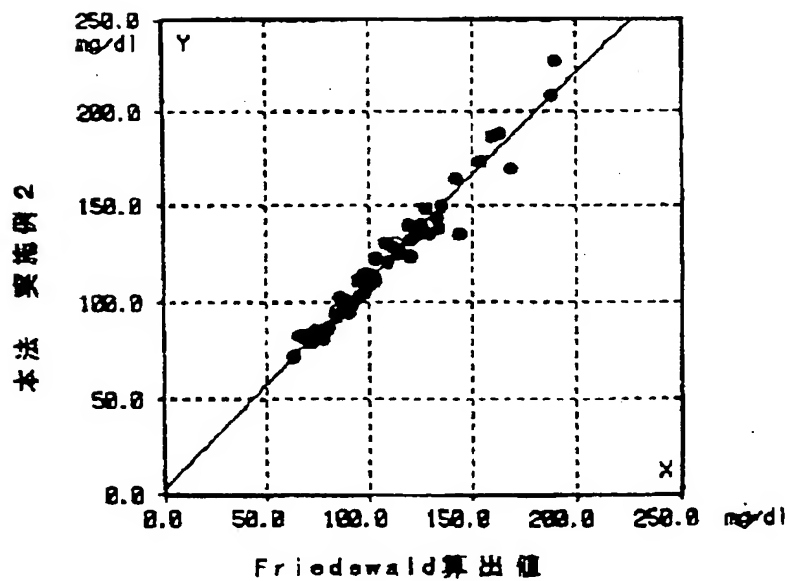
る。

【図3】実施例4においてHDL、VLDL及びCM非存在下及び存在下におけるLDLコレステロール濃度と本発明の方法により測定された吸光度との相関関係を示す図である。

【図1】

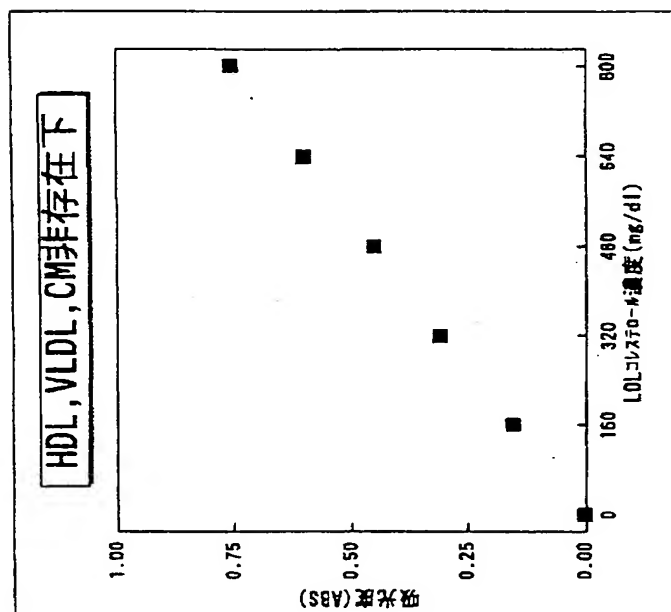
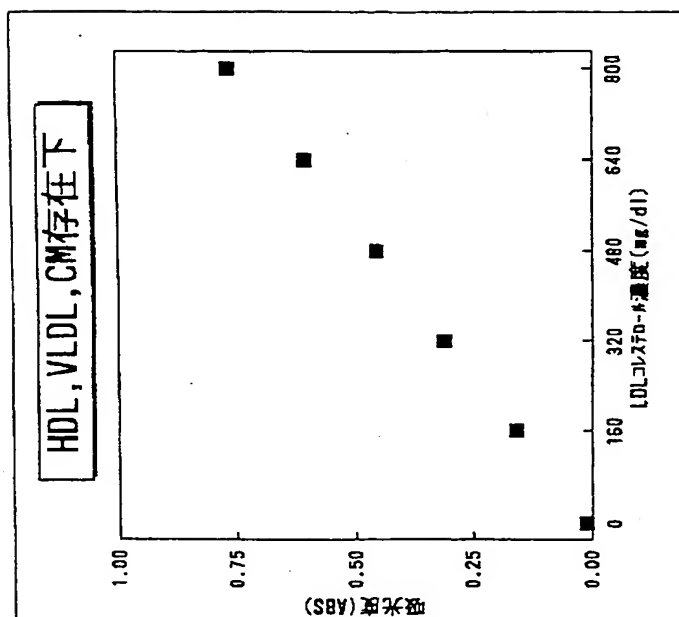


【図2】





【図 3】



フロントページの続き

(72)発明者 小原 秀一

新潟県五泉市大字木越字鏡田 1 3 5 9-1

デンカ生研株式会社鏡田工場内

(72)発明者 藤原 明

新潟県五泉市大字木越字鏡田 1 3 5 9-1

デンカ生研株式会社鏡田工場内

(72)発明者 高杉 憲一

新潟県五泉市大字木越字鏡田 1 3 5 9 - 1

デンカ生研株式会社鏡田工場内

(72)発明者 岡田 正彦

新潟県新潟市白山浦 1 - 3 1 5